



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 030817 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: IPT Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Est.S.Paulo S/A

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 60633674000155

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AV. PROF. ALMEIDA PRADO, 532, BUTANTÃ

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05508901

País: Brasil

Telefone: (11)37674025

Fax:

Email: patentes@ipt.br

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: R QUIRINO DE ANDRADE, 215 - CENTRO

Cidade: SÃO PAULO

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: fabiola@reitoria.unesp.br

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PELA PRESENÇA DA ENZIMA APS-REDUTASE

Resumo: "IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PELA PRESENÇA DA ENZIMA APS-REDUTASE" consiste em um método para monitorar o risco de biocorrosão em sistemas de produção de petróleo com foco na construção de biossensores para detecção de BRS com base na utilização de anticorpos monoclonais e policlonais como moléculas de reconhecimento de enzima APS-redutase, altamente conservada como alvo para o reconhecimento do anticorpo devido à sua presença no grupo característico de BRS. Eletrodos comerciais de ouro interdigitais (IDEs) Dropsens G-IDEAU5 foram usados como transdutor, pois oferecem vantagens tais como uma maior sensibilidade, resposta dinâmica rápida, razão de aspecto elevada e também aumento na relação sinal-ruído para as medições impedimétricas usando espectroscopia de impedância. O IDE é conectado a um potenciostato com analisador de frequência adequado para realizar espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

O processo de obtenção do biossensor impedimétrico para a detecção de bactérias redutoras de sulfato (BRS) usando anticorpos específicos tem como alvo a enzima APS-redutase, usada como marcador do grupo de BRS e permitindo sua detecção indireta. Anticorpos monoclonais e policlonais específicos para a detecção de BRS são obtidos após imunização de animais, utilizando como antígeno um peptídeo sintético representativo da enzima APS-redutase. Anticorpos do tipo monoclonal (1) anti APS-redutase foram imobilizados na superfície de eletrodos impressos interdigitais modificada pela tecnologia de formação de monocamadas auto-organizadas (Self-Assembled Monolayer – SAM) usando cisteamina para acoplamento do anticorpo.

Figura a publicar: 01

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 8

Nome: PATRICIA LÉO

CPF: 09019289845

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Av. Professor Almeida Prado, 532

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05508-901

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: patentes@ipt.br

Inventor 2 de 8

Nome: MARIA FILOMENA DE ANDRADE RODRIGUES

CPF: 09359689890

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Av. Professor Almeida Prado, 532

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05508-901

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: patentes@ipt.br

Inventor 3 de 8

Nome: DÉBORA DO CARMO LINHARES

CPF: 34620728896

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Av. Professor Almeida Prado, 532

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05508-901

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: patentes@ipt.br

Inventor 4 de 8

Nome: KLEBER LANIGRA GUIMARÃES

CPF: 28525591882

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Engenheiro, arquiteto e afins

Endereço: Av. Professor Almeida Prado, 532

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05508-901

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: patentes@ipt.br

Inventor 5 de 8

Nome: MÁRIO RICARDO GONGORA RUBIO

CPF: 00059654899

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Engenheiro, arquiteto e afins

Endereço: Av. Professor Almeida Prado, 532

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05508-901

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: patentes@ipt.br

Inventor 6 de 8

Nome: LUCIANA WASNIEVSKI SILVA DE LUCA RAMOS

CPF: 84361352968

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Engenheiro, arquiteto e afins

Endereço: Av. Professor Almeida Prado, 532

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05508-901

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: patentes@ipt.br

Inventor 7 de 8

Nome: JONAS GOMES DOS SANTOS

CPF: 33087473839

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outros técnicos de nível médio das ciências físicas, químicas, engenharia e afins

Endereço: Av. Professor Almeida Prado, 532

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05508-901

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: patentes@ipt.br

Inventor 8 de 8

Nome: ANTONIO FERNANDO MONTEMOR

CPF: 97871885804

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215 - República

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: fabiola@reitoria.unesp.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	boleto biosensor.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo_Biosensor.pdf
Reivindicação	Reivindicações_Biosensor.pdf
Desenho	Desenhos_Biosensor.pdf
Resumo	Resumo_Biosensor.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.



001-9

RECIBO DO SACADO

Local de Pagamento					Vencimento
Pagável em qualquer Banco					Contra-apresentação
Cedente					Agência/Código Cedente
INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial					2234-9/333.028-1
Data do Documento	Nº. documento	Espécie doc.	Aceite	Data Proces.	Nosso Número
21/12/2016	1610299714	RC	N	21/12/2016	00.000.2.2.16.1029971.4
Uso Banco	Carteira	Espécie	Quantidade	Valor	(=)Valor Documento
	18/027	R\$			R\$ 70,00
Número:	NN Complementar:	Petição: Eletrônico			(-)Desconto/Abatimento
Natureza: 10 - Patente de					
Cod	Serviço	Petição Vinculada RPI	Valor		(-) Outras deduções
200 - Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT		-	- R\$ 70,00		
Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança					R\$ 70,00
Sacado					
IP T Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Est.S.Paulo S/A					
AV. PROF. ALMEIDA PRADO, 532, BUTANTÁ, São Paulo, BR/SP, 05508901					
Sacador/Avalista					
Corte na linha pontilhada					Autenticação mecânica - Controle Cedente



001-9

00199.53637 10000.022169 10299.714211 2 00000000007000

Local de Pagamento					Vencimento
Pagável em qualquer Banco					Contra-apresentação
Cedente					Agência/Código Cedente
INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial					2234-9/333.028-1
Data do Documento	Nº. documento	Espécie doc.	Aceite	Data Proces.	Nosso Número
21/12/2016	1610299714	RC	N	21/12/2016	00.000.2.2.16.1029971.4
Uso Banco	Carteira	Espécie	Quantidade	Valor	(=)Valor Documento
	18/027	R\$			R\$ 70,00
Instruções:					(-)Desconto/Abatimento
1. Valores expressos em reais.					(-) Outras deduções
2. Pagamento em cheque, anotar no verso o 'Nosso Número'.					(+)Mora/Multa
3. Pagamento via SIAFI(OB-FATURA): Identificar na 'ob' o 'Nosso Número'.					(+)Outros Acréscimos
4. Vencimento contra apresentação.					(=)Valor Cobrado
Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança					R\$ 70,00
Sacado					
IP T Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Est.S.Paulo S/A					
AV. PROF. ALMEIDA PRADO, 532, BUTANTÁ, São Paulo, BR/SP, 05508901					
Sacador/Avalista					
Corte na linha pontilhada					Autenticação mecânica - Ficha de Compensação

IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PELA PRESENÇA DA ENZIMA APS-REDUTASE

CAMPO DE APLICAÇÃO

[001] A invenção, pertencente ao setor de investigação ou análise de materiais por métodos específicos de material biológico por meio de testes imunológicos para enzimas, visa atender à necessidade de diagnóstico rápido e mais sensível de avaliação da presença e quantificação de bactérias redutoras de sulfato, parâmetro para o gerenciamento de risco de corrosão induzida por microrganismos (*Microrganism induced corrosion* – MIC) em dutos e reservatórios metálicos, utilizando um imunossensor para detecção e quantificação dos microrganismos alvo mediante a presença da enzima APS redutase.

ESTADO DA TÉCNICA

[002] A prevenção dos processos de corrosão é de fundamental importância para a indústria petroleira, uma vez que os custos relacionados a corrosão resultam em grandes gastos na exploração, transporte e refino do petróleo. A redução química do sulfato pela ação de microrganismos anaeróbicos, e consequente produção de gás sulfídrico, leva ao processo de corrosão induzida por microrganismos.

[003] Entre os grupos de microrganismos mais representativos relacionados ao processo de corrosão estão os procariotos redutores de sulfato (PRS), convencionalmente conhecidos como bactérias redutoras de sulfato (BRS), as quais estão envolvidas em 95% dos casos de biocorrosão. A quantificação destes microrganismos nos ambientes de armazenamento e transporte de petróleo e derivados é importante para a tomada de medidas preventivas de rotina, como limpeza de dutos ou adição de biocidas.

[004] As BRS conhecidas estão heterogeneamente agrupadas em grupos filogenéticos distintos, sendo cinco de Bactéria (com gêneros pertencentes à *Deltaproteobacteria*, *Clostridia*, *Nitrospirae*, *Thermodesulfobacteria*,

Thermodesulfobiaceae) e três de Archaea (*Archaeoglobus* em Euryarchaeota e *Termocladium* e *Claudirvirga* em Crenarchaeota) (MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. *The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. June, p. 441–454, 2008).

[005] Os métodos tradicionais para estimar quantitativamente as BRS envolvem técnicas trabalhosas que devem ser realizadas em laboratório e que dependem do crescimento dos microrganismos cultiváveis do grupo em questão. Em geral, os métodos convencionais para monitorar a população de BRS constituem-se na estimativa do número mais provável (NMP), determinado após uma etapa de crescimento em tubos múltiplos em meio seletivo, que demanda de 4 a 28 dias de incubação. A leitura dos resultados é dependente da observação visual de um precipitado preto, representado principalmente por sulfeto férrico resultante do metabolismo microbiano.

[006] Comercialmente disponível, a Sani Check SRB[®], fabricado pela Biosan Laboratories, Inc., fornece a opção de quantificar BRS utilizando kits para inoculação e cultivo. O método de detecção e quantificação é baseado no crescimento em meio de cultura e os resultados podem ser lidos em até 5 dias de incubação, apresentando distinção de concentrações que podem variar de 10¹ a 10⁶ células/mL.

[007] Uma variedade de protocolos foi apresentada para monitorar a concentração da população microbiana de BRS incluindo detecção por qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*), ou hibridação fluorescente *in situ* e ensaios imunológicos (MALIK, S., BEER, M., MEGHARAJ, M., NAIDU, R. *The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water*, **Environment International** v. 34, p. 265–276, 2008).

[008] O emprego de ensaios imunológicos para a detecção de bactérias redutoras de sulfato já é explorado comercialmente no kit de diagnóstico “Rapid Check II” (códigos de produto SD50950 e SD50951), produzido de acordo com o documento US 4,999,286 (*Sulfate reducing bacteria determination and control*). Este método é baseado na detecção da enzima APS redutase, comum às BRS, por meio de anticorpos policlonais, obtidos a partir da imunização de coelhos

utilizando a enzima APS redutase, a qual, por sua vez, foi purificada a partir de um extrato celular de bactérias redutoras de sulfato de um único gênero.

[009] O procedimento do kit envolve resumidamente os seguintes passos: I) lise química das células em suspensão com material de coleta, II) ligação da enzima APS redutase com anticorpos policlonais Anti-APS redutase, III) concentração dos complexos antígeno-anticorpo em uma membrana contendo anticorpos de captura, IV) revelação do complexo antígeno-anticorpo com um material proteico conjugado com peroxidase, V) lavagem da membrana, VI) revelação com reagente cromogênico, VII) leitura visual da intensidade de cor e verificação da correspondência entre cada intensidade e a concentração de BRS, possibilitando a distinção entre quatro possíveis concentrações de BRS, assim como a não detecção.

[0010] Os métodos de detecção e quantificação baseados em cultivo e em ensaios imunológicos com resposta colorimétrica envolvem estimativas e parâmetros subjetivos, isto é, a coloração observada a olho nu. Visando diminuir a subjetividade e os intervalos de resposta, alguns grupos se dedicaram ao desenvolvimento de biossensores capazes de fornecerem parâmetros quantitativos para a detecção de BRS.

[0011] Um biossensor é uma ferramenta analítica caracterizada pela presença de um elemento de origem biológica como molécula de reconhecimento e de um transdutor que gera um sinal compatível com a intensidade da reação, sendo utilizado para a detecção e/ou quantificação de parâmetros bioquímicos.

[0012] O produto alvo, ao entrar em contato com a molécula de reconhecimento imobilizada na superfície de um substrato ou dispositivo, promove uma mudança físico-química no conjunto, a qual pode ser identificada por um transdutor, gerando um sinal eletrônico passível de interpretação. Eletrodos de ouro já são usados para imobilização de enzimas e anticorpos, e geometrias como os eletrodos interdigitados oferecem vantagens como sensibilidade aumentada, rápida dinâmica de reação, alta razão de aspecto e aumento da relação sinal/ruído para medidas impedimétricas usando espectroscopia de impedância.

[0013] O princípio de reconhecimento de BRS (ou suas partes integrantes) por meio de reações antígeno-anticorpo foi incorporado às propostas de confecção de biossensores para detecção do grupo alvo. Anticorpos contra BRS ou suas partes integrantes representativas foram imobilizados em superfícies ou dispositivos sensores, funcionando como a molécula de reconhecimento, sendo que a forma de aquisição de sinal foi uma das variáveis dos trabalhos.

[0014] Wan e col. tem investigado diferentes biossensores para quantificar bactérias redutoras de sulfato. Em 2009 imobilizaram a concavalina A na superfície de eletrodo de ouro, previamente modificada com ácido 11-mercaptoundecanóico, e investigaram a reação de afinidade por *Desulfovibrio caledoiensis* (WAN, Y.; ZHANG, D.; HOU, B. *Monitoring microbial populations of sulfate-reducing bacteria using an impedimetric immunosensor based on agglutination assay*; **Talanta**, v. 80, p. 218–223, 2009). O monitoramento foi efetuado por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Em outro artigo (WAN, Y. Zhang, D., Wang, Y., Hou, B.. *A 3D-impedimetric immunosensor based on foam Ni for detection of sulfate-reducing bacteria*. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 2, p. 288–291, 2010), nanopartículas de ouro foram funcionalizadas com anticorpo policlonal anti-BRS e depositadas em espuma de níquel; a detecção de BRS nas concentrações de $2,1 \times 10^1$ até $2,1 \times 10^7$ UFC/mL foram por EIS. Em outro artigo (WAN, Y.; ZHANG, D.; HOU, B. *Determination of sulphate-reducing bacteria based on vancomycin-functionalised magnetic nanoparticles using a modification-free quartz crystal microbalance*. **Biosensors and Bioelectronics**, v.25, n.7, p. 1847–1850, 2010) nanopartículas magnéticas funcionalizadas com vancomicina foram empregadas para detectar BRS empregando microbalança de cristal de quartzo (*quartz crystal microbalance - QCM*). O biossensor QCM deu uma resposta distinta à bactéria sensível à vancomicina, *Desulfotomaculum*, mas não tinha resposta coerente à bactéria resistente a vancomicina, *Vibrio anguillarum*. No artigo publicado em 2011, Wan e col. empregaram a autopolimerização de dopamina para a imobilização do anticorpo anti-BRS; a reação de afinidade foi monitorada por QCM e EIS (WAN, Y.; ZHANG, D.; HOU, B. *Direct immobilisation of antibodies on a bioinspired*

architecture as a sensing platform. Biosensors and Bioelectronics, v. 26, n. 5, p. 2595–2600, 2011).

[0015] A detecção e quantificação de bactérias redutoras de sulfato são importantes para o monitoramento do risco de corrosão induzida por microrganismos (MIC) em dutos e reservatórios de petróleo e derivados. Grandes empresas petroleiras adotam como rotina ensaios para a detecção e quantificação de bactérias redutoras de sulfato, sendo este resultado importante para tomadas de decisão quanto a medidas de controle microbiano como passagem de *Pipeline Inspection Gauge* (PIG) e aplicação de antimicrobianos.

[0016] “IMUNOSSENSOR impedimétrico PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PELA PRESENÇA DA ENZIMA APS-REDUTASE” permite a detecção do grupo de bactérias redutoras de sulfato por meio de reações antígeno-anticorpo entre a enzima APS-redutase, representativa do grupo das BRS, presente em extratos celulares e anticorpos monoclonais e policlonais anti-APS. Não foram encontrados documentos que descrevam método específico de obtenção de anticorpos mono e policlonais (anti-APS) específicos para detectar bactérias do grupo BRS utilizando como antígeno um peptídeo sintético da enzima APS-redutase comum ao grupo microbiano BRS; nem método de construção de um imunossensor impedimétrico usando anticorpo monoclonal ou policlonal anti-APS como detector da presença de bactérias redutoras de sulfato; nem processo de imobilização de anticorpos anti-APS em monocamadas de cisteamina automontadas através da ligação covalente em eletrodos comerciais, embora o uso de cisteamina para formar monocamadas já seja usual, mas não para este anticorpo; e, finalmente, a aplicação de imunossensor para rápida detecção e determinação e estimativa da concentração de bactérias do grupo BRS em extratos celulares de amostras aquosas por medidas de impedância, sendo estas as novidades e atividade inventiva do imunossensor impedimétrico.

[0017] Os anticorpos policlonais e monoclonais utilizados nesta construção apresentam abrangência de reconhecimento de culturas puras e distintas de BRS, bem como BRS presentes em amostras ambientais após

enriquecimento, mostrando eficácia para a detecção de BRS presentes em ambiente de dutos de petróleo e derivados.

RESUMO DA INVENÇÃO

[0018] “IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS redutoras DE SULFATO PELA PRESENÇA DA ENZIMA APS-REDUTASE” consiste em um sistema mais eficiente, preciso e rápido para monitorar uma população de bactérias envolvidas no processo de biocorrosão em ambientes de produção de petróleo, com foco na construção de biossensores para detecção BRS com base na utilização de anticorpos monoclonais e policlonais como moléculas de reconhecimento de uma enzima altamente conservada, presente na maioria das BRS, sendo a enzima APS-redutase selecionada como alvo para o reconhecimento do anticorpo devido à sua presença no grupo característico de BRS. Esta enzima é amplamente distribuída em diferentes grupos de seres vivos, com características comuns a todas elas, mas com marcas específicas para certos grupos. Com base nestas considerações, o antígeno para imunização de animais e produção de anticorpos representa um fragmento da enzima APS-redutase, comum no grupo BRS.

[0019] Os anticorpos obtidos anti-APS redutase do tipo monoclonal foram imobilizados em eletrodos comerciais interdigitais de ouro (*interdigitated electrodes* – IDEs) Dropsens® G-IDEAU5, usados como transdutor. O dispositivo G-IDEAU5 é composto por dois eletrodos com duas faixas de conexão, feitos de filme fino de ouro/cromo depositados em um substrato de vidro. O IDE é conectado a um potenciostato com analisador de frequência adequado para realizar espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

[0020] Os eletrodos de ouro já foram utilizados para a imobilização de enzimas e anticorpos, sendo que IDEs oferecem vantagens tais como uma maior sensibilidade, resposta dinâmica rápida, razão de aspecto elevada e também aumento na relação sinal-ruído para as medições impedimétricas usando espectroscopia de impedância.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0021] Figura 1. Fotografia ilustrativa em escala real da detecção BRS em ensaio imunológico qualitativo (*Dot Immunobinding Assay* – DIBA) usando anticorpos monoclonal (a) e policlonal (b), apresentando reação positiva para a detecção de amostras de culturas puras de BRS “cepa a” (1) e “cepa b” (2) e para amostra de BRS de campo (3) e apresentando reação negativa (sem coloração) contra amostras de culturas puras das bactérias *Escherichia coli* (4) e *Pseudomonas sp* (5).

[0022] Figura 2. Diagramas de impedância (Nyquist) dos eletrodos de ouro modificados pela SAM (*self assembled monolayer*) com anticorpos monoclonais anti-APS redutase, acoplados após reação com 3 concentrações de antígenos, sendo 1:500 (4,0 µg/mL), 1:1500 (1,3 µg/mL), e 1:2500 (0,8 µg/mL)

[0023] Figura 3. Gráfico da correlação entre a resistência à transferência de elétrons do biossensor e a concentração de peptídeo sintético APS-redutase.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO E CONCRETIZAÇÃO

[0024] “Imunossensor IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PELA PRESENÇA DA ENZIMA APS-REDUTASE” consiste em um sistema mais eficiente, preciso e rápido para monitorar populações de microrganismos indutores de corrosão em ambientes de produção de petróleo com foco na construção de biossensores para detecção BRS com base na utilização de anticorpos monoclonais (1) e policlonais (2) como moléculas de reconhecimento de uma enzima altamente conservada, presente na maioria das BRS, sendo a enzima APS-redutase selecionada como alvo para o reconhecimento do anticorpo devido à sua presença no grupo característico de BRS. Esta enzima é amplamente distribuída em diferentes grupos de seres vivos, com características comuns a todas elas, mas com marcas específicas para certos grupos. Com base nestas considerações, o antígeno para imunização de animais e produção de anticorpos deve representar um fragmento da enzima APS-redutase, comum no grupo BRS.

[0025] Para tanto, sequências de aminoácidos referentes a APS-redutase de linhagens do gênero representativo *Desulfotomaculum* foram importadas do *GenBank - National Center for Biotechnology Information* – NCBI e alinhadas utilizando o software BIOEDIT v7.0.9.0. As referências para este alinhamento foram: EF 442956, EF 442960, EF 442961, EF 442963 até EF 442972. Este alinhamento foi encaminhado a um fornecedor dos anticorpos que, utilizando softwares adequados, verificou as características de antigenicidade e hidrofobicidade dos fragmentos da sequência consenso, selecionando o mais promissor. A sequência escolhida foi sintetizada, resultando em um peptídeo de 15 a 40 aminoácidos que corresponde à região próxima ao C-terminal da subunidade α da enzima APS-redutase (adenosina 5-fosfosulfato redutase).

[0026] O peptídeo parte de APS-redutase foi apresentado como antígeno para a imunização de coelhos e camundongos. A imunização dos coelhos resultou na produção de anticorpos policlonais que foram recuperados a partir do soro extraído do sangue dos animais. Os anticorpos monoclonais dependem da imunização de camundongos e foram gerados pela técnica de obtenção de hibridomas. Ambos os tipos de anticorpos, policlonais e monoclonais, apresentaram reação específica contra duas linhagens puras de BRS (incluindo *Desulfotomaculum nigrificans*) e contra amostras de campo enriquecida para BRS. Não foi observada reação inespecífica contra linhagens de *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.*

[0027] Os anticorpos anti-APS redutase do tipo monoclonal foram selecionados para imobilização em eletrodos comerciais interdigitais de ouro - IDEs Dropsens[®] G-IDEAU5, usados como transdutor. Esta escolha se deve à possibilidade de produzir os anticorpos monoclonais de interesse em biorreatores, de forma independente de novas imunizações. No caso dos anticorpos policlonais, cada lote deve ser obtido a partir de nova imunização e confirmação de reconhecimento, podendo levar à variação entre lotes.

[0028] O dispositivo G-IDEAU5 é composto por dois eletrodos com duas faixas de conexão, feitos de filme fino de ouro/cromo depositados em um substrato de vidro, com largura e espaçamento entre dígitos de 5 μ m, número de

dígitos de 250 x 2 e comprimento do dígito de 6760 µm. O IDE é conectado a um potenciostato com analisador de frequência adequado para realizar espectroscopia de impedância eletroquímica - EIS.

[0029] O IDE é conectado a um potenciostato com analisador de frequência adequado para realizar espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Os eletrodos de ouro já foram utilizados para a imobilização de enzimas e anticorpos. IDEs oferecem vantagens tais como uma maior sensibilidade, resposta dinâmica rápida, razão de aspecto elevada e também aumento na relação sinal-ruído para as medições impedimétricas usando espectroscopia de impedância.

[0030] O anticorpo monoclonal (1) utilizado nesta construção apresenta abrangência de reconhecimento de culturas puras e distintas de BRS, bem como BRS presentes em amostras ambientais, mostrando eficácia para a detecção de BRS presentes em amostras ambientais coletadas em dutos de petróleo e derivados. O anticorpo policlonal (2) também apresentou a mesma capacidade de reconhecimento que o anticorpo monoclonal (1). Assim, para a concretização da invenção optou-se pela imobilização do anticorpo monoclonal (1) no “IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PELA PRESENÇA DA ENZIMA APS-REDUTASE”.

[0031] O “IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PELA PRESENÇA DA ENZIMA APS-REDUTASE” é construído de acordo com as seguintes etapas: Etapa 1 de determinação de um peptídeo sintético representativo da enzima APS redutase de BRS e produção de anticorpos monoclonais (1) e anticorpos policlonais (2) contra este peptídeo; Etapa 2 de preparação dos eletrodos com a monocamada auto organizada (SAM); Etapa 3 de imobilização dos anticorpos monoclonais (1) anti-APS redutase de BRS em monocamadas automontadas por ligação covalente em eletrodos comerciais (SPE); e, Etapa 4 de aplicação de imunossensor para detecção e determinação

ou estimativa da concentração de antígeno representativo do grupo BRS em lisados de amostras aquosas por medida de impedância, sendo:

[0032] A Etapa 1 constituída de:

a) Determinação do peptídeo sintético utilizando como antígeno para a imunização dos animais e obtenção dos anticorpos, primeiramente sequências de aminoácidos referentes às subunidades alfa e beta, dando continuidade com a subunidade alfa (gene aprA) da enzima APS-redutase de linhagens do gênero representativo *Desulfotomaculum* alinhadas, utilizando software apropriado, de acordo com as referências EF 442956, EF 442960, EF 442961, EF 442963 até EF 442972. Este alinhamento resulta em uma sequência consenso de até 650 aminoácidos, preferencialmente de 550 a 650 aminoácidos, cuja base é

MANFETVVVNTDLLIVGGGMSACGA AVEASYWAKKHGLKVTLVDKAAMDRSGA
VAMGLSAINLYIGQAAGDNTVEDYVRYVRQDLMGITREDLVYSIARHVDSTVHLF
EKWGLPIWKDKDGKYVHEGRWQIMINGESYKIIVAEAAKNALNSLGDKDNIYERV
FIVEPLMDGDRCVGVGFSVRENKEYVFKAKAVLVGMGGAVHVFRPRSTGEG
GRSWYPPFNTGSSAYFTLKAGAEMTCQEVRFIPVRFKDAYGPVGAWFLLFKSVA
TNAFGEDYMKTHPDVLEQYAPYGMTKPIPANLRNHLGLIDERAGKGPIYMQTAE
AIQRLAQEMPDEKQRKKLKELEAEAWEDFLDMTISQALLWAATNTFPPEEKPSEI
AAGNPYFIGSHSGASGAWVSGPETIAPPEYQWGYTNMSTVKGLFCAGDASGAS
SHKFSSGSFTEGRIAGKSAIRFIVENNQEPSVDDAQVEALKARILKPLDLFEQFKG
ATDPDVNPYIRPKQFMFRLQKIMDEYAGGVSKSFTTNKHLLEKGLELLTMLKE
DSEKLAENLHELIRCWENVHRMWQAEAHI.

[0033] Esta sequência é encaminhada para verificação das características de antigenicidade e hidrofobicidade dos fragmentos, selecionando o mais promissor para produção de anticorpos. A sequência escolhida é então sintetizada, resultando em um peptídeo de 15 a 40 aminoácidos que correspondem à região próxima ao C-terminal da subunidade α da enzima APS-redutase (adenosina 5-fosfosulfato redutase). A sequência base o peptídeo sintético deve compreender também eventuais substituições por aminoácidos de estrutura e ou função semelhantes.

b) Obtenção dos anticorpos, em que anticorpos monoclonais (1) e policlonais (2) anti-APS redutase são obtidos a partir de animais imunizados contra um peptídeo sintético representando uma sequência consenso conservada de APS redutase do grupo BRS, sendo que a estrutura do peptídeo sintético é determinada a partir das características da enzima alvo. Os anticorpos policlonais (2) são obtidos após purificação do soro de coelhos imunizados e anticorpos monoclonais (1) são obtidos pela técnica de hibridoma, utilizando células de camundongo imunizado. O anticorpo monoclonal (1) secretado pelo hibridoma é purificado a partir do sobrenadante da cultura;

c) Cultivo de bactérias e preparação do lisado bacteriano, onde culturas puras de pelo menos uma, preferencialmente duas linhagens de BRS e amostra de campo (3) são cultivadas em meio modificado de POSTGATE (POSTGATE, J. R. *Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 29 no. 4, p. 425-441, 1965) em temperatura de 25 até 35 °C, preferencialmente 30 °C, durante 2 a 10 dias, preferencialmente 4 dias sob condições anaeróbias. Para controle negativo do ensaio de reconhecimento, são utilizadas duas linhagens não representativas do grupo das BRS, preferencialmente *Pseudomonas sp* e *Escherichia coli*, cultivadas em meio caldo nutriente. Todas as linhagens cultivadas ou enriquecimentos são separados por centrifugação entre 4000 e 8000 x g, preferencialmente 6000 x g, por um período de 15 a 30 min, preferencialmente 20 min, e as células são lisadas utilizando até 20 volumes de tampão de lise, preferencialmente de 10 volumes de tampão de lise, formado por 1% de SDS, 5 mmol / L de EDTA, 20 mmol / L pH tris 8,0, 1 mmol / L de PMSF e ditiotreitól 10 mmol / L. Em seguida, as suspensões de células lisadas são homogeneizadas e incubadas em temperatura de 80 até 100 °C, preferencialmente a 90 °C, durante 15 até 30 min, preferencialmente 20 min, sendo o material resultante centrifugado entre 10.000 e 12.000 x g, preferencialmente a 12.000 x g, por 3 até 10 min, preferencialmente 5 min, e o sobrenadante contendo proteínas é mantido a -10 até -30 °C, preferencialmente a -20 °C;

d) Reconhecimento biológico por imunoensaio, onde o reconhecimento de anticorpos monoclonais (1) e policlonais (2) é confirmado por

ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), utilizando como antígeno o peptídeo sintético que representa a enzima chave para o processo de corrosão induzida por BRS, recomendando-se que sejam testadas diferentes concentrações de revestimento antigênico (peptídeo sintético), anticorpo de captura e anticorpo conjugado.

[0034] Ensaios qualitativos (*Dot Immunobinding Assay* - DIBA) são realizados para avaliar a especificidade do anticorpo para BRS. Os sobrenadantes de lisados de cultura pura de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e duas ou mais linhagens de BRS, bem como lisados de enriquecimentos de amostras de campo com a presença de BRS, são incubados com o anticorpo monoclonal (1) e anticorpos policlonais (2). Posteriormente são revelados utilizando anticorpo anti-camundongo ou anti-coelho conjugado com peroxidase - HRP, respectivamente.

[0035] No ensaio qualitativo DIBA, tanto anticorpos monoclonais (1) como policlonais (2) anti-APS redutase são capazes de reconhecer a enzima APS redutase presente em sobrenadantes de lisados de células de BRS, tanto na cultura pura como em amostras de campo (3) enriquecidas, como mostrado na Figura 1, sendo que para os lisados de *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* não se observa reação positiva. Ressalta-se que em amostra de campo (3), realizadas simultaneamente, respostas positivas também são observadas para ambos os anticorpos, indicando o potencial para a detecção de BRS utilizando um dispositivo sensor ANTI APS-REDUTASE baseada no princípio da reação antígeno-anticorpo.

[0036] Etapa 2, consistindo de:

Preparação do eletrodo, que deve ser iniciada pela limpeza da superfície de ouro do IDE, consistindo de sua imersão em solução RCA-1 (5 - H₂O DI + 1 - NH₄OH + 1 - H₂O₂) pelo menos durante 15 min, lavagem em água deionizada e secagem em corrente de nitrogênio filtrado, limpeza em plasma de oxigênio durante pelo menos 10 min, lavagem em água deionizada e secagem em corrente de nitrogênio filtrado. Em seguida, os eletrodos são imersos em etanol em temperatura acima de 70 °C durante pelo menos 5 min, lavados em água

deionizada, secos numa corrente de nitrogênio filtrado, imersos em acetona em ebulição durante pelo menos 5 min e expostos a limpeza em ultrassom em isopropanol durante 10 minutos. Em seguida, os eletrodos são lavados com água deionizada e secos numa corrente de nitrogênio filtrado.

[0037] Cloridrato de cisteamina ($C_4H_{12}N_2S_2 \cdot 2HCl$), ácido 11-mercaptoundecanóico ($SH(CH_2)_{10}CO_2H$) e solução de glutaraldeído a 25 % são usados para a preparação da monocamada auto-organizada (*Self-Assembled Monolayer* - SAM). Água deionizada é utilizada para preparar solução de 3×10^{-2} mol / L de cloridrato de cisteamina e para lavar os eletrodos para as medições eletroquímicas. Etanol a 80 % em volume é utilizado para preparar solução 10^{-2} mol / L de ácido 11-mercaptoundecanóico. Uma solução 0,1 mol / L de tampão fosfato a pH 7,4 é usada para preparar solução de glutaraldeído a 2,4% em volume e também para preparar o eletrólito de suporte que contém o par redox necessário para realizar as medições de EIS. A preparação da SAM consiste na imersão dos eletrodos em solução de cloridrato de cisteamina por 18 horas, seguido de lavagem com água deionizada e imersão na solução hidroalcoólica de 11-mercaptoundecanóico durante no mínimo 2 horas. Após lavagem com água deionizada, os eletrodos são então imersos na solução de glutaraldeído durante no mínimo 2 horas e depois se lava com solução tampão *Phosphate Buffer Saline* – PBS.

[0038] Eletrodos interdigitais disponíveis comercialmente podem ser utilizados como base para a construção do biossensor (imunossensor impedimétrico) para identificar e quantificar a presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS) em ambientes aquosos.

[0039] Etapa 3, consistindo de:

Para a imobilização do anticorpo monoclonal (1) anti-APS redutase, os eletrodos recobertos com a SAM são imersos em solução aquosa de anticorpo, preferencialmente 1:1000 em volume, durante no mínimo 2 horas sob agitação de 100 a 200 rpm, preferencialmente a 150 rpm, a 25 a 37 °C, preferencialmente 37 °C, e em seguida durante 14 a 20 horas, preferencialmente durante 16 horas, a 2 a 8 °C, preferencialmente 4 °C. O biossensor então é tratado com 2% de solução

de BSA-PBS (albumina de soro bovino em tampão fosfato) durante no mínimo 2 horas, sob agitação de 100 a 200 rpm, preferencialmente a 150 rpm, a 25 a 37 °C, preferencialmente 37 °C, visando bloquear sítios não específicos, sendo então lavados com tampão PBS e utilizado imediatamente, podendo ser usado em até 4 horas.

[0040] Etapa 4 de aplicação do imunossensor para rápida determinação ou estimativa da concentração de bactérias do grupo BRS em lisados de amostras aquosas por medidas de impedância, consiste de:

a) O reconhecimento de antígenos por medidas de impedância é realizado pela imersão dos eletrodos com a superfície já modificada e com o anticorpo imobilizado na suspensão com ou sem o peptídeo sintético alvo APS-redutase em diferentes diluições, recomendando-se 1:500 (4 µg/mL), 1:1500 (1,3 µg/mL) e 1:2500 (0,8 µg/mL) incubados a temperatura de 25 a 40 °C, preferencialmente 37 °C, durante no mínimo 2 horas. Após o tempo de reação, o eletrodo é imerso num eletrólito (tampão e par redox de ferricianetos de potássio - ($K_3Fe(CN)_6$ e $K_4Fe(CN)_6$)) e submete-se a passagem de corrente alternada - CA entre 5 e 15 mV, preferencialmente 10 mV, para obter-se a curva de espectroscopia de impedância eletroquímica.

b) As medições de impedância eletroquímicas são realizadas com um equipamento potenciostato utilizando uma sinusóide de 10 mV, dentro da faixa de frequências de 0,05 Hz a 50 kHz e 10 pontos por década de frequências à temperatura ambiente. O programa FRA (analisador de resposta de frequência) e os ferricianetos de potássio ($K_3Fe(CN)_6$ e $K_4Fe(CN)_6$) são utilizados como eletrólito para a caracterização eletroquímica do sensor utilizando EIS.

REIVINDICAÇÕES

1. “IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PELA PRESENÇA DA ENZIMA APS-REDUTASE”, caracterizado por ser construído de acordo com as seguintes etapas: Etapa 1 de determinação de um peptídeo sintético representativo da enzima APS redutase de BRS e produção de anticorpos monoclonais (1) e anticorpos policlonais (2) contra este peptídeo; Etapa 2 de preparação dos eletrodos com a monocamada auto organizada (SAM); Etapa 3 de imobilização dos anticorpos monoclonais (1) anti-APS redutase de BRS em monocamadas automontadas por ligação covalente em eletrodos comerciais; e, Etapa 4 de aplicação de imunossensor para detecção e determinação ou estimativa da concentração de antígeno representativo do grupo BRS em lisados de amostras aquosas por medida de impedância, sendo:

A Etapa 1 constituída de: a) Determinação do peptídeo sintético, utilizando como antígeno para a imunização dos animais e obtenção dos anticorpos primeiramente sequências de aminoácidos referentes à subunidade alfa (gene *aprA*) da enzima APS-redutase de linhagens do gênero representativo *Desulfotomaculum* alinhadas, utilizando software apropriado, de acordo com as referências EF 442956, EF 442960, EF 442961, EF 442963 até EF 442972, verificando as características de antigenicidade e hidrofobicidade dos fragmentos do consenso até 650 aminoácidos, selecionando o mais promissor para produção de anticorpos, sendo a sequência escolhida então sintetizada resultando em um peptídeo de 15 a 40 aminoácidos correspondentes à região próxima ao C-terminal da subunidade α da enzima APS-redutase (adenosina 5-fosfosulfato redutase); b) Obtenção dos anticorpos, em que anticorpos monoclonais (1) e policlonais (2) anti-APS redutase são obtidos a partir de animais imunizados contra um peptídeo sintético representando uma sequência consenso conservada de APS redutase do grupo BRS, sendo que a estrutura do peptídeo sintético é determinada a partir das características da enzima alvo; anticorpos policlonais (2) são obtidos após purificação do soro de coelhos imunizados e anticorpos monoclonais (1) são obtidos pela técnica de hibridoma, utilizando células de camundongo imunizado,

sendo que o anticorpo monoclonal (1) secretado pelo hibridoma é purificado a partir do sobrenadante da cultura; c) Cultivo de bactérias e preparação do lisado bacteriano, onde culturas puras de pelo menos uma linhagem de BRS e amostra de campo (3) são cultivadas em meio modificado de POSTGATE (POSTGATE, J. R. *Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 29 no. 4, p. 425-441, 1965) em temperatura de 25 até 35 °C durante 2 a 10 dias sob condições anaeróbias; para controle negativo do ensaio de reconhecimento são utilizadas duas linhagens não representativas do grupo das BRS, cultivadas em meio caldo nutriente, sendo todas as linhagens cultivadas ou enriquecimentos separados por centrifugação entre 4000 e 8000 x g, por um período de 15 a 30 min, e as células são lisadas utilizando até 20 volumes de tampão de lise formado por 1% de SDS, 5 mmol / L de EDTA, 20 mmol / L pH tris 8,0, 1mmol / L de PMSF e ditioneitol 10 mmol / L; em seguida, as suspensões de células lisadas são homogeneizadas e incubadas em temperatura de 80 até 100 °C, durante 15 até 30 min, sendo o material resultante centrifugado entre 10.000 e 12.000 x g por 3 até 10 min, e o sobrenadante contendo proteínas é mantido a -10 até -30 °C; d) Reconhecimento biológico por imunoenensaio, onde o reconhecimento de anticorpos monoclonais (1) e policlonais (2) é confirmado por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), utilizando como antígeno o peptídeo sintético que representa a enzima chave para o processo de corrosão induzida por BRS, pelo teste de diferentes concentrações de revestimento antigênico (peptídeo sintético), anticorpo de captura e anticorpo conjugado.

Etapa 2, consistindo de: a) Preparação do eletrodo, iniciada pela limpeza da superfície de ouro do IDE por sua imersão em solução RCA-1 (5 - H₂O DI + 1 - NH₄OH + 1 - H₂O₂) pelo menos durante 15 min, lavagem em água deionizada e secagem em corrente de nitrogênio filtrado, limpeza em plasma de oxigênio durante pelo menos 10 min, lavagem em água deionizada e secagem em corrente de nitrogênio filtrado; em seguida, os eletrodos são imersos em etanol em temperatura acima de 70 °C durante pelo menos 5 min, lavados em água deionizada, secos numa corrente de nitrogênio filtrado, imersos em acetona em ebulição durante pelo menos 5 min e expostos a limpeza em ultrassom em isopropanol durante 10 minutos, sendo em seguida os eletrodos lavados com

água deionizada e secos numa corrente de nitrogênio filtrado; a preparação da SAM consiste em imergir os eletrodos em solução de cloridrato de cisteamina por 18 horas, seguido de lavagem com água deionizada e imersão na solução hidroalcoólica de 11-mercaptoundecanóico durante no mínimo 2 horas; após lavagem com água deionizada, os eletrodos são então imersos em solução de glutaraldeído durante no mínimo 2 horas e depois lavados com solução tampão *Phosphate Buffer Saline* – PBS.

Etapa 3, consistindo na imobilização do anticorpo monoclonal (1) anti-APS redutase pela imersão dos eletrodos modificados com SAM em solução aquosa de anticorpo em diluição responsiva durante no mínimo 2 horas sob agitação de 100 a 200 rpm, 25 a 37 °C, e em seguida durante 14 a 20 horas, a 2 a 8 °C, sendo o biossensor então tratado com 2% de solução de BSA-PBS (albumina de soro bovino em tampão fosfato) durante no mínimo 2 horas, sob agitação de 100 a 200 rpm a 25 a 37 °C, e então lavados com tampão PBS e utilizado em até 4 horas;

Etapa 4, aplicação do imunossensor para rápida determinação ou estimativa da concentração de bactérias do grupo BRS em lisados de amostras aquosas por medidas de impedância, consistindo de: a) o reconhecimento de antígenos por medidas de impedância ser realizado pela imersão dos eletrodos com a superfície já modificada e com o anticorpo imobilizado na suspensão com ou sem o peptídeo sintético alvo APS-redutase em diferentes diluições, incubados a temperatura de 25 a 40 °C, durante no mínimo 2 horas; após o tempo de reação, o eletrodo é imerso num eletrólito (tampão e par redox de ferricianetos de potássio - ($K_3Fe(CN)_6$ e $K_4Fe(CN)_6$)) e submete-se a passagem de corrente alternada (CA) entre 5 e 15 mV, para obter-se a curva de espectroscopia de impedância eletroquímica; e, b) as medições de impedância eletroquímicas são realizadas com um equipamento potenciostato utilizando uma sinusóide de 10 mV, dentro da faixa de frequências de 0,05 Hz a 50 kHz e 10 pontos por década de frequências à temperatura ambiente, sendo o programa FRA (analisador de resposta de frequência) e os ferricianetos de potássio ($K_3Fe(CN)_6$ e $K_4Fe(CN)_6$) utilizados como eletrólito para a caracterização eletroquímica do sensor utilizando EIS.

2. “IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PELA PRESENÇA DA ENZIMA APS-REDUTASE”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por Etapa 1 a) para determinação do peptídeo sintético, utilizando como antígeno para a imunização dos animais e obtenção dos anticorpos primeiramente sequências de aminoácidos referentes à subunidade alfa (gene *aprA*) da enzima APS-redutase de linhagens do gênero representativo *Desulfotomaculum* alinhadas, utilizando software apropriado, de acordo com as referências EF 442956, EF 442960, EF 442961, EF 442963 até EF 442972, verificando as características de antigenicidade e hidrofobicidade dos fragmentos do consenso de 550 a 650 aminoácidos, selecionando o fragmento mais promissor para produção de anticorpos, sendo a sequência escolhida então sintetizada resultando em um peptídeo de 15 a 40 aminoácidos correspondentes à região próxima ao C-terminal da subunidade α da enzima APS-redutase (adenosina 5-fosfosulfato redutase); b) Obtenção dos anticorpos, em que anticorpos monoclonais (1) e policlonais (2) anti-APS redutase são obtidos a partir de animais imunizados contra um peptídeo sintético representando uma sequência consenso conservada de APS redutase do grupo BRS, sendo a estrutura do peptídeo sintético determinada a partir das características da enzima alvo; anticorpos policlonais (2) são obtidos após purificação do soro de coelhos imunizados e anticorpos monoclonais (1) são obtidos pela técnica de hibridoma, utilizando células de camundongo imunizado, sendo o anticorpo monoclonal (1) secretado pelo hibridoma purificado a partir do sobrenadante da cultura; c) Cultivo de bactérias e preparação do lisado bacteriano, onde culturas puras de pelo menos uma linhagem de BRS e amostra de campo (3) são cultivadas em meio modificado de POSTGATE (POSTGATE, J. R. *Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 29 no. 4, p. 425-441, 1965) em temperatura de 25 até 35 °C durante 2 a 10 dias sob condições anaeróbias; para controle negativo do ensaio de reconhecimento são utilizadas duas linhagens não representativas do grupo das BRS, cultivadas em meio caldo nutriente, sendo todas as linhagens cultivadas ou enriquecimentos separados por centrifugação entre 4000 e 8000 x g, por um período de 15 a 30 min, e as células são lisadas utilizando até 20 volumes de tampão de lise formado por 1% de SDS,

5 mmol / L de EDTA, 20 mmol / L pH tris 8,0, 1 mmol / L de PMSF e ditiotreitól 10 mmol / L; em seguida, as suspensões de células lisadas são homogeneizadas e incubadas em temperatura de 80 a 100 °C, durante 15 a 30 min, sendo o material resultante centrifugado entre 10.000 e 12.000 x g por 3 a 10 min, e o sobrenadante contendo proteínas é mantido a -10 a -30 °C; d) Reconhecimento biológico por imunoenensaio, onde o reconhecimento de anticorpos monoclonais (1) e policlonais (2) é confirmado por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), utilizando como antígeno o peptídeo sintético que representa a enzima chave para o processo de corrosão induzida por BRS, pelo teste de diferentes concentrações de revestimento antigênico (peptídeo sintético), anticorpo de captura e anticorpo conjugado; na Etapa 2, para a preparação dos SAMs, serem utilizados cloridrato de cisteamina ($C_4H_{12}N_2S_2 \cdot 2HCl$) em solução de 3×10^{-2} mol/L em água deionizada; solução 10^{-2} mol/L de ácido 11-mercaptoundecanóico ($SH(CH_2)_{10}CO_2H$) em solução de Etanol a 80% em volume, e uma solução 0,1 mol/L de tampão fosfato a pH 7,4 é usada para preparar solução de glutaraldeído a 2,4 % em volume; os eletrodos interdigitais serem aqueles disponíveis no estado da técnica; a Etapa 3, consistindo da imobilização do anticorpo monoclonal (1) anti-APS redutase pela imersão dos eletrodos SAM modificados em solução aquosa de anticorpo 1:1000 em volume durante no mínimo 2 horas sob agitação de 150 rpm a 37 °C, e em seguida durante 16 horas a 4 °C, sendo biossensor então tratado com 2% de solução de BSA-PBS (albumina de soro bovino em tampão fosfato) durante no mínimo 2 horas, sob agitação 150 rpm a 37 °C, e então lavados com tampão PBS, podendo ser usado imediatamente; Etapa 4, aplicação do imunossensor para rápida determinação ou estimativa da concentração de bactérias do grupo BRS em lisados de amostras aquosas por medidas de impedância, consistindo de: a) o reconhecimento de antígenos por medidas de impedância ser realizado pela imersão dos eletrodos com a superfície já modificada e com o anticorpo imobilizado na suspensão com ou sem o peptídeo sintético alvo APS-redutase em diluições de 1:500 (4 µg/mL), 1:1500 (1,3 µg/mL) e 1:2500 (0,8 µg/mL) incubados a temperatura de 37 °C; após o tempo de reação, submete-se o eletrodo a passagem de corrente alternada (CA) de 10 mV,

3. “IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PELA PRESENÇA DA ENZIMA APS-REDUTASE”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por uma solução 0,1 mol/L de tampão fosfato a pH 7,4 ser usada para preparar o eletrólito de suporte que contém o par redox necessário para realizar as medições de EIS.

4. “IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PELA PRESENÇA DA ENZIMA APS-REDUTASE”, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por a sequência consenso de aminoácidos ter como base:

MANFETVVVNTDLLIVGGGMSACGAAVEASYWAKKHGLKVTLVDKAAMDRSGA
VAMGLSAINLYIGQAAGDNTVEDYVRYVRQDLMGITREDLVYSIARHVDSTVHLF
EKWGLPIWKDKDGKYVHEGRWQIMINGESYKIIVAEAAKNALNSLGDKDNIYERV
FIVEPLMDGDRCVGVAVGFSVRENKEYVFKAKAVLVGMGGAVHVFRPRSTGEG
GRSWYPPFNTGSSAYFTLKAGAEMTCQEVRFIPVRFKDAYGPGAWFLLFKSVA
TNAFGEDYMKTHPDVLEQYAPYGMTKPIPANLRNHLGLIDERAGKGPIMQTAE
AIQRLAQEMPDEKQRKKLKELEAEAWEDFLDMTISQALLWAATNTFPPEEKPSEI
AAGNPYFIGSHSGASGAWVSGPETIAPPEYQWGYTNMSTVKGLFCAGDASGAS
SHKFSSGSFTEGRIAGKSAIRFIVENNQEPSVDDAQVEALKARILKPLDLFEQFKG
ATDPDVNPNYIRPKQFMFRLQKIMDEYAGGVSKSFTTNKHLLEKGLELLTMLKE
DSEKLAENLHELIRCWENVHRMWQAEAHI.

5. “IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PELA PRESENÇA DA ENZIMA APS-REDUTASE”, de ACORDO com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por a sequência base o peptídeo sintético compreender também eventuais substituições por aminoácidos de estrutura e ou função semelhantes.

DESENHOS

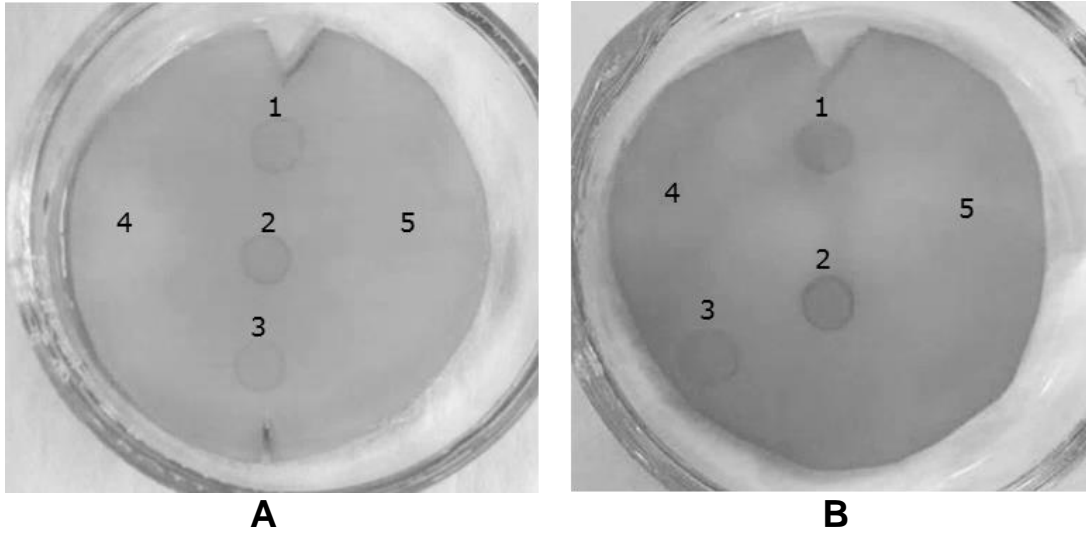


FIGURA 1

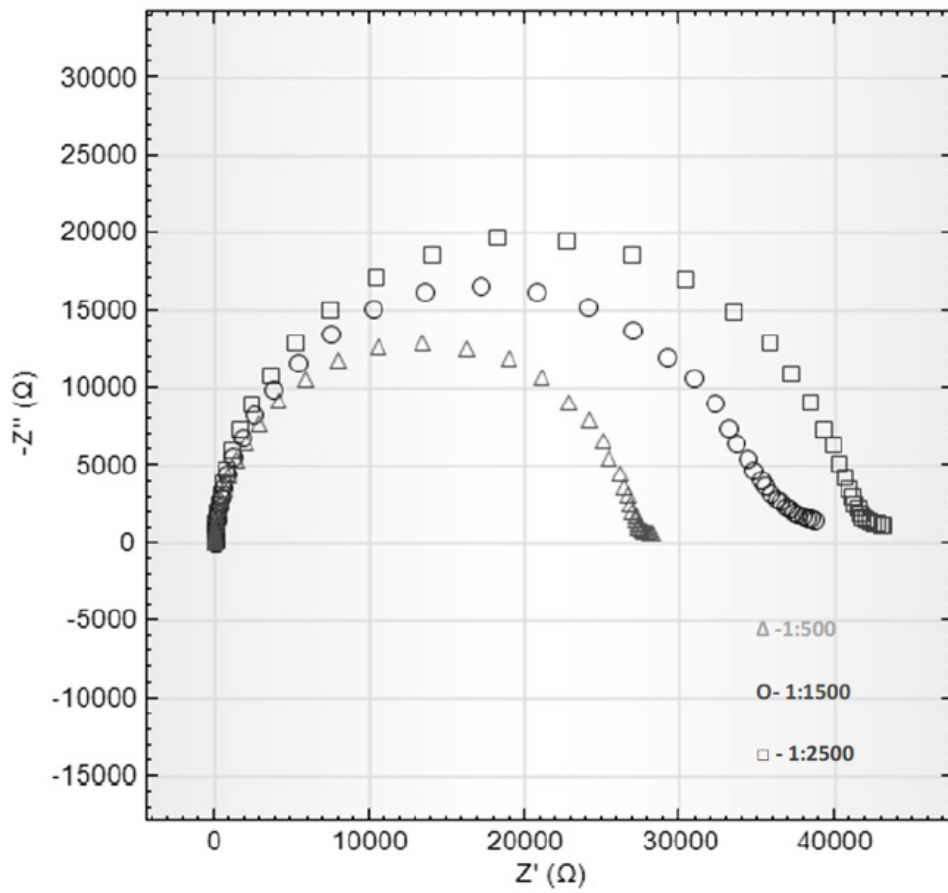


FIGURA 2

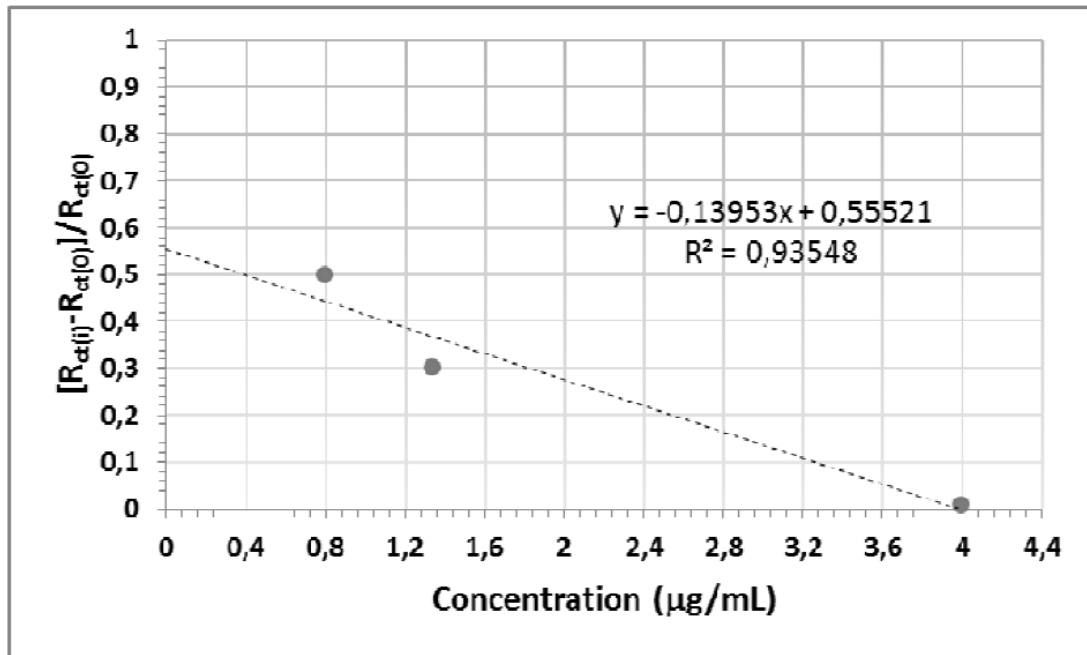


FIGURA 3

RESUMO

“IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PELA PRESENÇA DA ENZIMA APS-REDUTASE” consiste em um método para monitorar o risco de biocorrosão em sistemas de produção de petróleo com foco na construção de biossensores para detecção de BRS com base na utilização de anticorpos monoclonais e policlonais como moléculas de reconhecimento de enzima APS-redutase, altamente conservada como alvo para o reconhecimento do anticorpo devido à sua presença no grupo característico de BRS.

Eletrodos comerciais de ouro interdigitais (IDEs) Dropsens G-IDEAU5 foram usados como transdutor, pois oferecem vantagens tais como uma maior sensibilidade, resposta dinâmica rápida, razão de aspecto elevada e também aumento na relação sinal-ruído para as medições impedimétricas usando espectroscopia de impedância. O IDE é conectado a um potenciostato com analisador de frequência adequado para realizar espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

O processo de obtenção do biossensor impedimétrico para a detecção de bactérias redutoras de sulfato (BRS) usando anticorpos específicos tem como alvo a enzima APS-redutase, usada como marcador do grupo de BRS e permitindo sua detecção indireta. Anticorpos monoclonais e policlonais específicos para a detecção de BRS são obtidos após imunização de animais, utilizando como antígeno um peptídeo sintético representativo da enzima APS-redutase. Anticorpos do tipo monoclonal (1) anti APS-redutase foram imobilizados na superfície de eletrodos impressos interdigitais modificada pela tecnologia de formação de monocamadas auto-organizadas (*Self-Assembled Monolayer* – SAM) usando cisteamina para acoplamento do anticorpo.